

## ОРИГІНАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 591.495.1:615.015.1

О.А. ШЕПЕЛЬ, Р.І. ЯНЧІЙ, Б.В. ДЖУРАН, О.Р. ЯНЧІЙ, Ю.Г. ФІЧУК, В.І. ШВЕЦЬ

### ВПЛИВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 ТА ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ-А НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ МИШЕЙ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ ЯЄЧНИКІВ

*На модели экспериментального иммунного повреждения яичников мышей антиовариальными антителами показано, что действие ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$  in vitro вызывает нарушение процесса оогенеза, о чем свидетельствует угнетение способности ооцитов возобновлять мейоз и формировать первое полярное тельце, что является абсолютно необходимым для нормального оплодотворения и развития эмбриона. Полученные данные являются актуальными с точки зрения повышенного интереса к использованию иммунорегуляторных цитокинов в комплексной терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта.*

**Ключевые слова:** цитокины, иммунное повреждение яичников, мейотическое созревание ооцитов.

\*\*\*

Використання імунорегуляторних цитокінів в комплексній терапії запальних захворювань урогенітального тракту зумовило інтерес до вивчення їх впливу на функції яєчників, зокрема на оогенез. Одним з необхідних умов для запліднення та імплантації ембріона є досягнення певного рівня зрілості ооцитів. За останні два десятиріччя з'ясовано, що дозрівання ооцитів відбувається не тільки під впливом гормонів, а й під контролем клітин імунної системи [ 1, 10, 11]. Згідно сучасних уявлень присутні у тканинах яєчника клітини імунної системи є потенційними модуляторами його функцій і нарівні з клітинами гранульози і теки здійснюють свою регуляторну дію через продукцію цитокінів [1, 5, 9]. Інтенсивно досліджується їх вплив на процеси фолікуло- та оогенезу, овуляцію, стероїдогенні функції фолікулярних клітин тощо [5, 6, 12, 14, 16, 17]. Нерідко розлади репродуктивної функції супроводжуються появою в сироватці крові антиоваріальних антитіл (АОАТ), що зустрічаються, наприклад, під час розвитку передчасної недостатності яєчника [13], при неспецифічних запальних ураженнях органів репродуктивної системи [15]. Встановлено, що при експериментальному імунному пошкодженні яєчників у мишей за допомогою ксеногенних АОАТ відбувається порушення мейотичного дозрівання ооцитів in vitro [3]. Є дані про те, що при аутоімунних захворюваннях зростає рівень прозапальних цитокінів в сироватці крові, зокрема інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) і фактору некрозу пухлини- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) [8]. Так, на моделях аутоімунного ураження яєчників, індукованого імунізацією екстрактом алогенного яєчника або введенням ксеногенних антиоваріальних антитіл, нами встановлено зміну продукції ФНП- $\alpha$  та ІФН- $\alpha$  у сироватці крові та гомогенаті яєчників мишей [18]. Окрім того нами виявлено супресивний вплив прозапальних цитокінів ІЛ-2 і ФНП- $\alpha$ , а також ІФН- $\alpha$  [3] на процес мейотичного дозрівання ооцитів мишей. Однак на сьогодні відсутні дані про вплив прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$  та ІЛ-2) на мейотичне дозрівання ооцитів мишей за умов експериментального імунного ушкодження яєчників, викликаного дією АОАТ, що склало мету нашого дослідження.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на статевозрілих самицях мишей лінії СВА з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1985). В експериментах була використана модель аутоімунного ураження яєчників. За допомогою імунізації кролів екстрактом яєчника мишей за загальноприйнятою схемою [3] були отримані ксеногенні антиоваріальні антитіла. Титр АОАТ у сироватці крові, визначений у реакції зв'язування комплементу, складав не менше 1:640. Із сироватки імунізованих тварин виділяли загальну гамма-глобулінову фракцію методом висолювання сірчаноокислим амонієм. Антитіла, що знаходились у  $\gamma$ -глобуліновій фракції, вводили мишам внутрішньовенно тричі щоденно в дозі 0,2 мг білка/20 г маси. Через 24 год після останньої ін'єкції мишей присипляли ефіром та використовували для подальших досліджень. Із яєчників

виділяли кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси, із яких шляхом пипетування отримували ооцити, що знаходились на стадії зародкового пухирця (ЗП+). Ооцити культивували в термостаті при 37°C у стерильних пластикових планшетах з 0,4 мл середовища DME, яке містило 15 ммоль/л NERES, 1,71 ммоль/л кальцію, антибіотики, а також один із досліджуваних цитокінів. Підраховували відсоткове відношення кількості ооцитів із розчиненим ЗП (ЗП-) після 4 год культивування та таких, що сформували перше полярне тільце (ПТ) після 20 год культивування до початкової кількості ЗП+ ооцитів. ФНП-α (ГНЦ "Вектор", Росія) або ІЛ-2 ("Ферментас", Литва) додавали до середовища DME, отримуючи розчини з їх кінцевими концентраціями: 2; 20 та 200 нг/мл.

Результати та їх обговорення

Дослідження впливу ФНП-α (2; 20 або 200 нг/мл) в умовах експериментального імунного ушкодження, викликаного шляхом внутрішньовенних ін'єкцій АОАТ показало пригнічуючий вплив на здатність ооцитів відновлювати мейоз і формувати перше ПТ (табл. 1). Тоді як при дії ІЛ-2 (2; 20 або 200 нг/мл) відбувалось навіть посилення супресивного ефекту на мейотичне дозрівання ооцитів мишей: на 24,4% зменшилась кількість ооцитів із зруйнованим ЗП, і на 15,7% тих, які сформували ПТ (табл. 2).

**Таблиця 1. Вплив ФНП-α на мейотичне дозрівання ооцитів мишей за умов імунного ушкодження яєчників великими дозами АОАТ (%), (M ± m; n = 6)**

Вплив	Концентрація	Кількість ооцитів (%):	
		ЗП- (4 год)	ПТ+ (20 год)
Контроль		93,67 ± 2,18	62,70 ± 2,42
ФНП-α	2 нг/мл	79,71 ± 2,17	35,14 ± 1,50
ФНП-α	20 нг/мл	68,05 ± 3,51	21,57 ± 5,20
ФНП-α	200 нг/мл	54,42 ± 3,97	19,46 ± 2,69
АОАТ	0,3 мг	79,00 ± 4,41 *	26,12 ± 1,65***
АОАТ + ФНП-α	0,3мг+2 нг/мл	80,68 ± 4,29*	28,41 ± 3,39***
АОАТ + ФНП-α	0,3мг+20 нг/мл	69,80 ± 1,75***	23,16 ± 2,15***
АОАТ + ФНП-α	0,3мг+200 нг/мл	56,14 ± 2,42*** <sup>xxx</sup>	20,17 ± 3,65***

Примітки:

1. \* – p < 0,05; \*\*\* – p < 0,001 – вірогідність відмінностей показників мейотичного дозрівання ооцитів порівняно з контролем;

2. <sup>xxx</sup> – p < 0,01 – вірогідність відмінностей показників мейотичного дозрівання ооцитів порівняно з дією АОАТ.

**Таблиця 2. Вплив ІЛ-2 на мейотичне дозрівання ооцитів мишей за умов імунного ушкодження яєчників великими дозами АОАТ (%), (M ± m; n = 6)**

Вплив	Концентрація	Кількість ооцитів (%):	
		ЗП- (4 год)	ПТ+ (20 год)
Контроль		94,78 ± 2,71	55,85 ± 3,33
ІЛ-2	2 нг/мл	90,14 ± 2,38	32,39 ± 3,39
ІЛ-2	20 нг/мл	82,45 ± 2,88	19,78 ± 2,24
ІЛ-2	200 нг/мл	80,30 ± 2,58	18,80 ± 3,58
АОАТ	0,3 мг	80,20 ± 3,86*	29,26 ± 3,65***
АОАТ + ІЛ-2	0,3мг+2 нг/мл	69,71 ± 5,08** <sup>##</sup>	20,47 ± 3,80*** <sup>#</sup>
АОАТ + ІЛ-2	0,3мг+ 20 нг/мл	65,28 ± 3,28*** <sup>###<sup>xx</sup></sup>	10,09 ± 3,42*** <sup>#<sup>xx</sup></sup>
АОАТ + ІЛ-2	0,3мг+200 нг/мл	57,06 ± 7,10*** <sup>###<sup>xx</sup></sup>	9,89 ± 2,93*** <sup>xxx</sup>

Примітки:

1. \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001 – вірогідність відмінностей показників мейотичного дозрівання ооцитів порівняно з контролем;

2. <sup>#</sup> – p < 0,05; <sup>##</sup> – p < 0,01; <sup>###</sup> – p < 0,001 – вірогідність відмінностей показників мейотичного дозрівання ооцитів порівняно з дією ІЛ-2 у відповідних концентраціях;

3. <sup>xx</sup> – p < 0,05; <sup>xxx</sup> – p < 0,01 – вірогідність відмінностей показників мейотичного дозрівання ооцитів порівняно з дією АОАТ.

Введення мишам ксеногенних АОАТ відтворює кінцевий етап аутоімунного процесу, що розвивається за гуморальним типом, і може спричиняти пряме ушкодження яєчників, що зумовлене

цитотоксичною реакцією за участі органоспецифічних антитіл і фіксованого комплементу. Під час аутоімунного процесу, що локалізується у певному органі-мішені, за межі зруйнованих клітин вивільняються медіатори запалення, які також викликають ураження тканини. Зокрема нами показано, що у мишей, яким вводили ксеногенні АОАТ, суттєво підвищується концентрація ФНП- $\alpha$  як у гомогенаті яєчника, так і у сироватці крові. Не виключено, що підвищення цього показника у сироватці крові відбувається внаслідок генералізованої активації клітин-продуцентів досліджуваного імуномодулятора при розвитку потужної запальної реакції організму, коли, як відомо [7] порушується принцип локальності продукції цитокінів.

Відомо, що синтез ІЛ-2 відбувається переважно Т-лімфоцитами хелперної субпопуляції під впливом антигенної стимуляції [2]. Даний цитокін, як і ФНП- $\alpha$ , приймає участь у розвитку клітинної ланки імунітету. Є також дані, що ІЛ-2 продукується клітинами гранульози [16]. Отже можна припустити, що введення АОАТ призводить до підвищення рівня ІЛ-2 і, врешті-решт, – до активації системи натуральних кілерів [2]. Імуногістохімічні і імунологічні дослідження показали, що в тканинах яєчника і у фолікулярній рідині є різні типи лейкоцитів, серед яких макрофаги, нейтрофіли, Т-клітини, кількість яких варіює в залежності від фази оваріального циклу. В-клітини і натуральні кілери (НК-клітини) в тканинах фолікула містяться у невеликих кількостях, і їх рівень значно не змінюється під час овуляції [1].

Підвищення рівня ІЛ-2 та ФНП- $\alpha$  за умов імунного ураження яєчників, на нашу думку, може здійснювати *in vivo* пряму пошкоджуючу дію на клітини фолікула або опосередковану – через активацію макрофагів та НК-клітин. Наші дослідження, проведені *in vitro*, показали, що безпосередня дія ІЛ-2 та ФНП- $\alpha$  на гранулярні клітини інтактних мишей викликає суттєві зміни їх життєздатності, що проявляється у зменшенні кількості живих та зростанні числа апоптотичних клітин, а при дії ФНП- $\alpha$  активується також некротичний шлях клітинної загибелі, який посилюється із збільшенням концентрації цитокіну, що є важливим механізмом ушкодження яєчника при дії ФНП- $\alpha$ , оскільки цей шлях клітинної смерті призводить до виходу внутрішньоклітинного вмісту лізосомальних ферментів з фолікулярних клітин з наступною активацією комплексу запальних і імунних реакцій у тканині яєчника [4].

Таким чином, отримані результати та їх аналіз засвідчують, що при розвитку аутоімунного процесу, який, як правило супроводжується підвищенням продукції прозапальних медіаторів відбувається порушення оогенезу, про що свідчить пригнічення здатності ооцитів відновлювати перший мейотичний поділ і формувати перше полярне тільце, що є абсолютно необхідним для нормального запліднення і подальшого розвитку плода.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Айзикович Б.И., Айзикович И.В., Хонина Н.А. и др. Иммунологические аспекты регуляции ранних этапов репродуктивного процесса (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2005. – Т. 11, №6. – С. 7-13.
2. Архипова С.В., Зорин Н.А., Янкин М.Ю. и др. Цитокины при инфаркте миокарда // Иммунология. – 2009. – № 2. – С. 104–107.
3. Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю., Шепель О.А., Янчій Р.І. Експериментальні аспекти порушення репродуктивної функції. – Київ: Міланик, 2010. – 184 с.
4. Грушка Н.Г., Бризгіна Т.М., Вознесенська Т.Ю. та ін. Зміни апоптотичної і некротичної загибелі фолікулярних клітин яєчника та клітин тимуса і селезінки у мишей з експериментальним імунним ураженням яєчника при дії талідоміду / Зб. наук. праць співр. КМАПО ім. П.Л.Шулика. – Київ. – 2008. – Випуск 13, книга 3. – С.107-113.
5. Хонина Н.А., Айзикович И.В., Шевела Е.Я. и др. Регуляторные факторы и цитокины в сыворотке и фолликулярной жидкости у женщин при контролируемой овариальной гиперстимуляции / Цитокины и воспаление. – 2005. Т. 4, № 2. – С. 38-44.
6. Янчій Р.І., Вознесенська Т.Ю., Шепель О.А. Цитокини та їх роль в репродуктивній системі // Фізіол. журн. – 2007. – Т. 53, № 3. – С. 82-90.
7. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 7-14.
8. Bagavan H., Adams S., Terranova P. et al. Autoimmune ovarian inflammation triggered by proinflammatory (Th1) T cells is compatible with normal ovarian function in mice // Biol. Reprod. – 1999. – Vol. 61. – P. 635-642.
9. Brannstrom M., Norman R.J. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function // Hum. Reprod. – 1993. – № 8. – P. 1762-1775.
10. Buculmez O., Arici A. Leukocytes in ovarian function. // Hum. Reprod. – 2000. – № 6. – P. 1-15.
11. Burke F., Relf M., Negus R., Balkwill F.A. Cytokine profile of normal and malignant ovary // Cytokine. – 1996. – № 8. – P. 579-585.
12. Gerard N., Caillaud M., Martoriati A. et al. The interleukin-1 system and female reproduction // J. Endocrinol. – 2004. – Vol. 180, № 2. – P. 203-212.
13. Luborsky J. Ovarian autoimmune disease and ovarian autoantibodies // J. Women's Health Gen. Based Med. – 2002. – Vol. 11, № 7. – P. 585-599.
14. Mikuni M. Effect of interleukin-2 and interleukin-6 on ovary in the ovulatory period – establishment of the new ovarian perfusion system and influence of interleukins on ovulation rate and steroid secretion // Hokkaido Igaku Zasshi. – 1995. – Vol. 70, № 4. – P. 561-572.
15. Niauru D.A. Ovarian insufficiency in chronic nonspecific salpingo-oophoritis // Fiziol. Cheloveka. – 1995. – Vol. 21, №3. – P.166-169.
16. Orvieto R., Genazzani A.R., Petraglia F. et al. Interleukin-2 production by cultured human granulosa cells // Int. J. Fertil. Womens Med. – 1997. – Vol. 42, № 5. – P. 297-300.
17. Sakumoto R., Okuda K. Possible actions of tumor necrosis factor-alpha in ovarian function // J. Reprod. Dev. – 2004. Vol. 50, №1. – P. 39-46.

**SHEPEL O.A., YANCHIY R.I., DZHURAN B.V., YANCHIY O.R., PHICHUK YU.G., V.I. SHVETS'**

**INFLUENCE OF INTERLEUKINE-2 AND TUMOR NECROSIS FACTOR-A ON MURINE OOCYTE MEIOTIC MATURATION UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNE OVARIAN FAILURE**

The effect of TNF- $\alpha$  and IL-2 on the oocyte meiotic maturation under the experimental immune ovarian failure induced by xenogenic anti-ovarian antibodies has been investigated. TNF- $\alpha$  and IL-2 have been shown to impair significantly the meiotic maturation of murine oocytes. This effect may be explain: 1) by the direct action of the cytokines on the follicle cells invoking a reduction in number of viable cells and increase amount of apoptotic and necrotic one; 2) by activation resident ovarian macrophages and NK-cells.

Key words: cytokines, immune ovarian failure, oocyte meiotic maturation.

Україна, Київ, Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України  
E-mail: elena-shepel@ukr.net

Дата поступлення: 05.12.2010 р.